Original Article / Özgün Makale

MEDICINE PALLIATIVE CARE

DOI: 10.47582/jompac.1028959
J Med Palliat Care 2021; 2(4): 118-123

Karbapeneme dirençli *Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomanas aeruginosa* suşlarında OXA 48 ve mcr-1 gen varlığının in house-PCR yöntemi ile araştırılması

Investigation of the presence of OXA 48 and mcr-1 genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* strains by in house-PCR method

Gülnur Tarhan[1], Funda Şahin[1], Salih Cesur[2]

[1]Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adıyaman, Türkiye
[2]Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara, Türkiye

Cite this article as/Bu makaleye atıf için: Tarhan G, Şahin F, Cesur S. Karbapeneme dirençli *Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomanas aeruginosa* suşlarında OXA 48 ve mcr-1 gen varlığının in house-PCR yöntemi ile araştırılması. J Med Palliat Care 2021; 2(4): 118-123.

ÖZ

Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* (KRE)'nin neden olduğu enfeksiyonlar, küresel sağlık için ciddi bir sorundur. Karbapenemler, kapsamlı uygulamaları nedeniyle günümüzde direnç mekanizmaları gelişmiştir. Karbapenemaz sentezleyen izolatların saptanması, dağılımlarının takip edilmesi ve uygun tedavinin sağlanabilmesi açısından oldukça önemlidir. Günümüz ilaç direncinin saptanmasında Real-time-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR), başta olmak üzere çeşitli ticari moleküler tanı yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak testlerin yapılabilmesi için pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyulması nedeni ile, rutin bakteriyoloji laboratuvarlarında uygulanabilecek güvenilir, pratik ve düşük maliyetli testlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışma, Etlik İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde çeşitli servislerde yatan hastalardan izole edilen genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) pozitif, karbapenemlere dirençli dirençli, kolistine duyarlı toplam 60 Gram-negatif bakteri (39 suş *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), 11 suş *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae* ve 10 suş *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*))'de izolatın mcr-1 ve bla$_{OXA-48}$ gen bölgelerinin varlığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Klinik örnekler konvansiyonel yöntemler ile izole edildikten sonra kesin tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri otomatize sistemle çalışılmıştır. GSBL ve kolistin direncinin doğrulanması disk difüzyon testi ve gradyen testleri ile yapıldı. PZR sonuçlarına göre *A. baumannii* suşunun 10 tanesinde, *K. pneumoniae* suşunun bir tanesinde ve *P. aeruginosa* suşunun bir tanesinde mcr-1 geni saptandı. *A. baumannii* suşunun 5 tanesinde, *K. pneumoniae* suşunun 2 tanesinde bla$_{OXA-48}$ geni saptandı. *A. baumannii* suşunun bir tanesinde her iki genin varlığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, karbapenemaz enzimi üretimi ve gen bölgesinin belirlenmesinde hızlı, tekrarlanabilir ve yüksek doğrulukta yeni tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Gram-negatif basiller, karbapenem direnci, kolistin , mcr-1, bla$_{OXA-48}$

ABSTRACT

Infections caused by carbapenemresistant *Enterobacteriaceae* (CRE) are a serious problem for global health. Carbapenems have developed resistance mechanisms due to their extensive applications. Identification of isolates expressing carbapenemase is important for that terms of monitoring their distribution and providing appropriate treatment. For detection of drugresistance, it is used various commercial molecular diagnostic methods, especially Real Time-polymerase chain reaction (RT-PCR). However, nowadays due to the needed for expensive equipment to carry out the tests, it is needed reliable, practical and low-cost tests that can be applied in routine bacteriology laboratories.

Our study was carried out to determine the presence of mcr-1 and bla$_{OXA-48}$ gene regions of 60 ESBL positive, carbapenems resistant, colistin sensitive Gram negative bacteriae (39 strains of *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), 11 strains of *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), and 10 strains of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)) from patients hospitalized in various wards of Etlik İhtisas Training and Research Hospital. The clinical samples were isolated by conventional methods, after that precise identificationand antibiotic susceptibility tests were performed with an automated system. Confirmation of ESBL and colistin resistance was done by disc diffusion and gradient testing. According to PCR results, mcr-1 gene was detected in ten *A. baumannii* strains, one *K. pneumoniae* and one *P. aeruginosa* strain. The bla$_{OXA-48}$ gene was detected in five *A. baumannii* strains and two *K. pneumoniae* strains. Both genes were detected in one of the *A. baumannii* strain. gene. As a result, it was needed new diagnostic methods that rapid, reproducible, highly accurate for determine carbapenemase enzyme production and gene presence.

Keywords: Gram-negative rods, carbapenem resistance, colistin, mcr-1, bla$_{OXA-48}$

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Salih Cesur, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara, Türkiye
E-mail/E-posta: scesur89@yahoo.com
Received/Geliş: 26.11.2021 **Accepted/Kabul:** 17.12.2021

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

GİRİŞ

Antibiyotik direnci insan sağlığını tehdit eden en önemli küresel sorunların başında gelmektedir. *Enterobacteriaceae* ailesinde son olarak karbapenemaz üreten türlerin ortaya çıkışı ve yayılması bu sorunu daha önemli hale getirmiştir (1,2). Uygulanan sağlık politikalarına bağlı olarak ülkeler arasında direncin yayılımı ve oranında farklılıklar bulunmaktadır. Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* (KRE), çeşitli bakteri türlerini içerir ve her birinin kendi ilaca direnç mekanizması vardır (3).

Karbapenemler, geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten patojenlerin birçoğuna karşı etkili ilaçlar olarak kabul edilir, ancak kapsamlı uygulamaları nedeniyle günümüzde direnç mekanizmaları gelişmiştir.

Kolistin çoklu ilaca dirençli Gram-negatif basillerin tedavisi için ayrılmış son basamak ilaçtır. İlacın tedavide yer alması, tarımsal ve hayvansal üretimde kullanımının yaygınlaşması, ilaca karşı direncin ortaya çıkmasına neden olmuştur (4). Kromozom aracılı kolistin direnci uzun zamandır bilinmektedir, ancak tek dikey geçişleri nedeniyle endişe verici değildir (5).

Plazmid kodlu kolistine dirençli mcr-1 geni ilk olarak Çin'deki çiftlik hayvanları ve insan örneklerinden *E. coli* izolatlarında rapor edilmiştir. *Enterobacteriaceae* türleri arasında mcr-1 geni varlığı 2016 yılından itibaren dünya genelinde farklı ülkelerden rapor edilmeye başlanmıştır. mcr-1 geni, fosfo-etanol-amintransferaz aktivitesini yapısal olarak değiştirir ve lipopolisakkarid fosfat grubu (LPS)'nun daha katyonik hale getirir. Buna bağlı olarak kolistin bağlanma afinitesini kaybeder. Günümüze kadar mcr-1 geni 47 farklı ülkede tanımlanmıştır. Dünya çapında yapılan birçok retrospektif çalışmada mcr-1 geninin en az 20 yıldır tespit edilmeden var olduğu tespit edilmiştir (2).

Enterobacteriaceae ailesinde kolistin direncinin ortaya çıkması ve yaygınlaşmasıyla insanlarda ve hayvanlarda mcr-1 ve bla_{OXA-48} genlerinin artması çok ilaca dirençli bakteri tedavisinde teropatik seçenekleri sınırlandırmaktadır.

Antibiyotik direncinin saptanmasında fenotipik yöntemlere ek olarak genotipik yöntemler ile direnç genlerinin tanımlanması direncin yaygınlığı, türü ve tedavi protokülünün planlanmasında önemli katkı sağlamaktadır (6). Günümüzde direncin tanımlanmasında Real-time-PZR (RT-PCR), başta olmak üzere çeşitli ticari moleküler tanı yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak testlerin pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyulması, rutin bakteriyoloji laboratuvarlarında uygulanabilecek güvenir, pratik ve düşük maliyetli testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Direnç gen varlığının belirlenmesinde in house-PZR yöntemi kolay uygulanabilir ve ucuz olması nedeni ile yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde çeşitli servislerde yatan hastalardan izole edilen GSBL pozitif, karbapenem dirençli 60 adet Gram-negatif bakteride *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ve *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) suşlarında mcr-1 ve blaOXA-48 gen bölgelerinin varlığını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kişiye ait biyolojik materyal kullanılmamıştır, kişisel veri yoktur. Çalışma laboratuvardan izole edilen bakteri suşlarında yapıldığı için etik kurul kararı gerektirmemektedir. Helsinki Deklarasyonu prensiplerine ve etik ilkelere bağlı kalınmıştır.

Bakteri İzolatları ve İdentifikasyon

Çalışmaya, 2012-2014 yılları arasında Etlik İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde çeşitli servislerden izole edilen, 60 adet Gram-negatif bakteri (sırasıyla; 39 tane *A. baumannii* suşu, 11 tane *P. aeruginosa* ve 10 tane *K. pneumoniae* suşu) dahil edildi. Klinik örnekler konvansiyonel yöntemler ile tanımlandıktan sonra kesin tanımlama ve antibiyotik duyarlılık duyarlılık testleri BD Phoenix ID/ AST (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) otomatize sistemi ile yapıldı. GSBL pozitif olarak tanımlanan örneklerde GSBL ve kolistin direnci disk difüzyon ve gradyen testleri ile doğrulandı. Test sonuçları Europen Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterlerine göre değerlendirildi. Çalışmada, kalite kontrolü amacı ile kontrolü olarak *E. coli* ATCC 25922 şusu kullanıldı.

Antibiyotik Duyarlılık Testi

Karbapeneme dirençli suşların antimikrobiyal duyarlılık testi BD Phoenix ID/AST otomatize sistemi ile 17 farklı antibiyotik için çalışıldı. Bu antibiyotikler; amikasin (AMK), ampisilin (AMP), aztreonem (ATM), seftiakson (CRO), sefuroksim (CXM), seftazidim (CAZ), siprofiloksasin (CIP),sefazolin (CF), ertapenem (ETP), gentamisin (GEN), imipenem (IPM), levfloksasin (LVX), sefepim (FP),sefotaksim (CTX), meropenem (MEM), tigiseklin (TGC) ve kolistin (CST)'den oluşmaktaydı.

GSBL Tanısının Doğrulanması/Gradiyent Test Çalışması

EUCAST kriterleri doğrultusunda sefotaksim/ klavulanik asit ya da seftazidim/klavulanik asit ya da sefepim/ klavulanik asit E-testleri ile GSBL varlığı araştırıldı. Minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerinin ≥8 mm veya elips şeklinde bozulması pozitif olarak kabul edildi.

Disk Difüzyon Çalışması

İzolatların karbapenemaza duyarlılıklarının belirlenmesi için McFarland No:0,5 bulanıklığına ayarlandıktan sonra Mueller-Hinton agar (MHA)'a ekimi yapıldı, ETP (10 mg), IMP (10 mg) ve MEM (10 mg) antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Antibiyotik duyarlılık sonuçları EUCAST önerileri doğrultusunda değerlendirildi.

Genotipik Testler

- **DNA izolasyonu:** Kültürde üremiş kolonilerden bir öze dolusu alınarak, 500 µl TE tamponu (10 mMTris, 1 mM EDTA, pH 8,0) ile suspanse edildi.15,000xg'de 10 dksantrifüjlendikten sonra, süpernatant atıldı. Çökeltiye ikinci kez aynı işlem uygulandı. Süpernatant atıldıktan sonra, çökelti 250 µldistile su ile süspanse edildi ve 20 dk boyunca kaynar su banyosunda bekletildi. Santrifüjleme işleminden sonra DNA içeren süpernatant steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Test süresine kadar -40°C' de bekletildi. Karbapenemaz direnç genlerinin araştırılmasında kullanılan primer dizileri **Tablo 1**'de verilmiştir.

Tablo 1. Karbapenemaz direnç genlerinin araştırılmasında kullanılan primer dizileri

Primerler	
mcr-1 F	5' GGGCCTGCGTATTTTAAGCG 3'
mcr-1 R	3' CATAGGCATTGCTGTGCGTC 5'
oxa-48 F	5' TTGGTGGCATCGATTATCGG 3'
oxa-48 R	3' GAGCCACTTCTTTTGTGATGGC 5'

- **PZR koşulları:** mcr-1reaksiyon karışım için 13,9 µl dH_2O, 2,5 µl 10XBuffer (Mg^{2+} free, Biomatik 1,25 Ml), 2,5 µl $MgCl_2$ (Biomatik 25 mM), 0,5 µl dNTPMix (Blirt 2 mM), 0,25 µl primerler, 0.1 µl TaqPolimeraz (Biomatik 5U/µl) ve 5 µl kalıp DNA eklendi (1). Hazırlanan PZR karışımı ısı döngü cihazında (MultigeneOptimaxLabnet) 95°C'de 5 dk, 95°C'de 30 sn, 60°C'de 30 sn, 72°C'de 30 sn (40 döngü), 72°C'de 5 dk döngüsünde gerçekleştirildi.Reaksiyon tamamlandıktan sonra, amplikonlar +4°C'de çalışma gününe kadar bekletildi.

  blaOXA-48reaksiyon karışım için 14,65 µl dH_2O, 2,5 µl 10XBuffer (Mg^{2+} free, Biomatik 1,25 Ml), 2,0 µl $MgCl_2$ (Biomatik 25 mM), 0,5 µl dNTPMix (Blirt 2 mM), 0,25 µl primerler, 0,1 µl TaqPolimeraz (Biomatik 5U/ µl) ve 5 µl kalıp DNA eklendi (1). Hazırlanan PZR karışımı ısı döngü cihazında (MultigeneOptimaxLabnet) 95°C'de 5 dk, 95°C'de 30 sn, 58°C'de 30 sn, 72°C'de 30 sn 72°C (30 Döngü)'de dk döngüsünde gerçekleştirildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, amplikonlar +4°C'de çalışma gününe kadar bekletildi.Agaroz jel elektroforezi %1,5 m/v konsantrasyon, 1 saat, 100 V'da 1X TBE'de görüntülendi.

BULGULAR

Çalışmaya 39 (%65) *A. baumannii*, 11 (%18) *P. aeruginosa* ve 10 (%17) *K. pneumoniae* suşu dahil edildi. Çeşitli servislerde yatan hastalardam alınan klinik örnekler; trakeal aspirat, idrar, kan, balgam ve yara örneklerinden oluşmaktaydı.

İzolatların %50 (30)'si idrar, %28 (17)'i trakeal aspirat, %13 (8)'ü balgam, %5 (3)'i yara ve %4 (2)'ü kan örneğinden oluşmaktaydı.

Gradyen testi sonucunda çalışmada kullanılan tüm izolatların GSBL ürettiği saptandı. GSBL tanımlamasından sonra suşların karbapenem grubu antibiyotiklere duyarlılığı disk difüzyon yöntemiyle çalışıldı. İzole edilen suşlarda otomatize sistemle saptanan karbapenem duyarlılık sonuçları ile disk difüzyon testi ile belirlenen duyarlılık sonuçları %100 uyumlu bulundu.

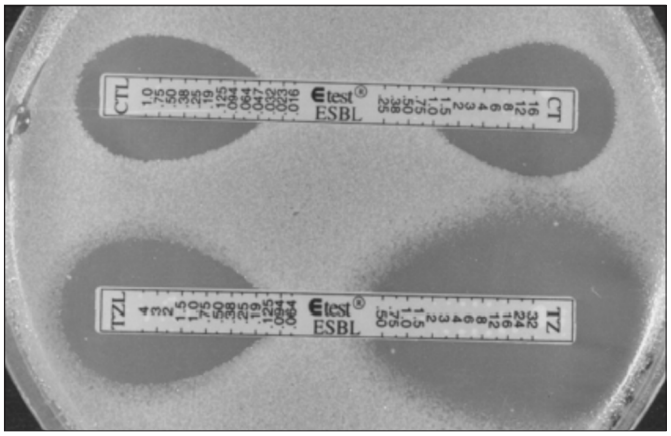
PZR sonuçlarına göre; *A. baumannii* suşlarının 10 tanesinde, *K. pneumoniae* suşlarının bir tanesinde ve *P. aeruginosa* suşlarının bir tanesinde mcr-1 geni saptandı. *A. baumannii* suşunun 5 tanesinde, *K. pneumoniae* suşlarının 2 tanesinde blaOXA-48 geni saptandı. *A. baumannii* suşunun bir tanesinde her iki genin varlığı tespit edilmiştir. Direnç geni tespit edilen tüm suşların aztreonama dirençli olduğu tespit edildi.

Çalışmamıza dahil edilen tüm bakteri suşlarının tamamının kolistine duyarlı olduğu tespit edildi.

TARTIŞMA

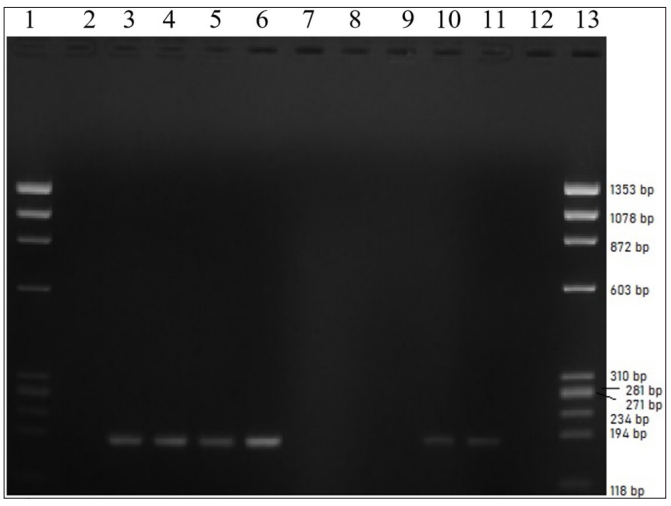
Enterobacteriaceae grubunda antibiyotik direnci önemli bir halk sağlığı problemidir. Karbapenem direncinin ortaya çıkması ile tedavi protokollerinin planlanması daha karmaşık bir hal almıştır. Belirgin karbapenem direncinin ortaya çıkması için, azaltılmış geçirgenlik veya çoklu-ilaç dışa akış pompalarının aşırı ekspresyonu gibi direnç mekanizmaları gereklidir (8). Karbapenemlere direnç gelişimi enzimatikinaktivasyon, hedef bölge ve efflux (atım) pompalarındaki mutasyonlardan kaynaklanabilir (9). Karbapenemaz üretimi klinik olarak en önemli direnç mekanizmasıdır. Çünkü neredeyse tüm beta-laktam antibiyotikleri hidrolize edebilen, yatay olarak plazmidler veya transpozonlara aktarılabilen, genlerle kodlanan ve genellikle diğer direnç etkenleriyle ilişkili enzimlerdir (10). Özellikle toplumda dolaşan direnç genlerinin varlığı bu sorunun ana kaynağını oluşturmaktadır.Son yıllarda dolaşımda saptanan genler blaKPC, blaVIM, blaIMP ve blaOXA-48'dir (11).

Karbapenemaz üreten Enterobakterlerin ortaya çıkması ve dünya genelinde yayılması önemli bir klinik endişeye sebep olmaktadır. Çünkü karbapenemler GSBL üreten çoklu ilaç dirençli *Enterobacteriaceae* üyelerinin neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde ilk sırada tercih



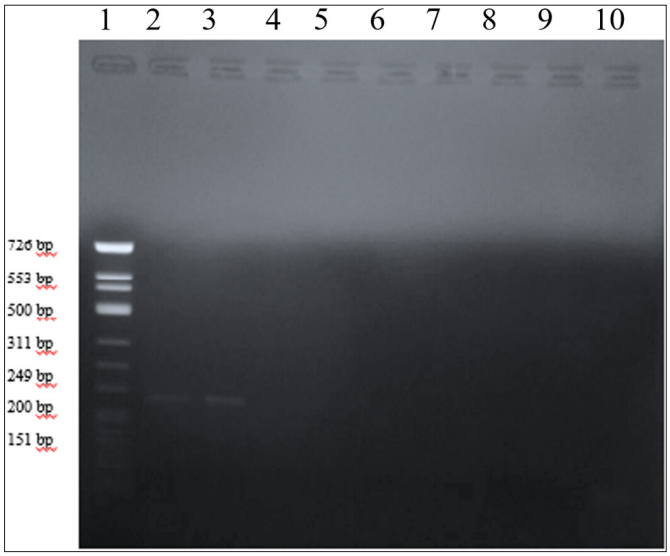
Şekil 1. Gradyen testi ile GSBL tayini. GSBL üretmeyen bir suş. (Sağ) GSBL üreten bir suşunseftazidim MIC >256 mg/mL iken, seftazidim/ klavulonik asit MIC değerinin 38 kat azaldığı görülmektedir (7)

Şekil 2. Her üç antibiyotik kombinasyonuna göre karbapeneme de dirençli olan izolat/ zon için üremeler (Çift disk sinerji yöntemi) (Başka bir çalışmadan alıntı yapılmıştır)



Resim 1: mcr-1 geninin bant görüntüsü

1) Haelll Marker, 2) Negatif kontrol, 3) Pozitif kontrol, 4) Örnek, 5) Örnek, 6) Örnek, 7) Örnek, 8) Örnek, 9) Örnek, 10) Örnek, 11) Örnek, 12) Örnek, 13) Haelll marker



Resim 2. blaOXA-48 geninin bant görüntüsü

1) Marker, 2) Pozitif kontrol, 3) Örnek, 4) Örnek, 5) Örnek, 6) Örnek, 7) Örnek, 8) Örnek, 9) Örnek, 10) Negatif kontrol

edilen ilaçlardandır.

Besi hayvanlarında kolistin dirençli *E. coli* prevalansının artması bununla birlikte *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* kolistin direnci saptanan diğer türlerdir (12). 2009–2012 yılları arasında ülkemizde yapılan bir çalışmada *Klebsiella* türleri (spp.)'nin kolistin duyarlılıkları araştırılmış ve yıllara göre kolistin direnci %3'ten %10'a daha sonrasında %20'ye yükseldiği bildirilmiştir (13).

Çin'de 2016 yılında hayvansal kaynaklı bir suşta mcr-1 geninin tespit edilmesi ile ilerleyen yıllarda insan ve hayvansal kaynaklı, farklı tür suşlarda da mcr-1 geni raporlanmıştır (14). Çoğunlukla *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de olmak üzere mcr-1 geninin yaygınlığının artması endişe kaynağıdır (3). Son araştırmalar dokuz farklı mcr geninin bulunduğunu ve bunların insan ve hayvan kaynaklı olduğunu göstermiştir. Çin'de yapılan pek çok araştırmada hayvanlardaki mcr-1 gen prevalansı %20, insanlardaki ise %1 oranında rapor edilmiştir. Avrupa'nın bazı ülkeleri, Kuzey ve Güney Amerika, Asya ve Afrika'da yapılan çeşitli çalışmalarda plazmid aracılı mcr-1 genine besinlerde, hayvanlarda ve insanlarda rastlanmıştır (15). Aynı anda mcr-1 ve blaOXA-48'i birlikte barındıran *E. coli* izolatlarına ilişkin raporlar nadirdir (16).

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (ECDC), *K. pneumoniae* izolatların arasında karbapenem direnç eğilimi 2014'te %1,8'den, 2017 yılında %8,6'ya yükseldiğini bildirmiştir (17). Ülkemizde 2001 yılında klinik izolatlarda karbapenem direnç genlerinden blaOXA-48 tespit edilmesinden beş yıl sonra blaOXA-48 pozitif *K. pneumoniae* hastane salgınları görülmüştür (18).

Yıldız ve ark. (19) 2019 yılında 26 merkezden toplanan GSBL pozitif 493 *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenem direnç oranlarını ve dirençten sorumlu

genleri araştırmıştır. İzolatların %49,7'si ETP'e, %40,6'sı IMP'e ve %43'ü MEM'e dirençli saptanmış, IMP ve MEM'e dirençli izolatların tümünde direnç gen varlığı genotipik olarak tespit edilmiştir. Genotipik olarak 493 izolatın %52,2 (207)'sinde karbapenemez direnç gen varlığı ve blaOXA-48'e sahip 108 suş tespit edilmiştir. Sunduğumuz çalışmada suşların tamamı en az bir karbapeneme dirençli olarak saptandı. Aynı anda üç karbapeneme dirençli suş tespit edilmemiştir. Suşların gen bölgelerine baktığımızda; 12 izolatta mcr-1, 7 izolatta bla_{OXA-48} geni tespit edilmiştir. Aynı zamanda bir izolatta her iki genin varlığı tespit edilmiştir. Arabacı ve ark. (20) 2019 yılındaki çalışmasında 57 GSBL pozitif izolatın 47'sinde (%82,45)blaoxa-48 genini ve 3 izolatta mcr-1 geninin varlığını bildirmiştir. Bizim çalışmamızda blaoxa-48 geninin saptanma oranı %12'dir.

Bilal ve ark. (21) 2021 yılında yapmış olduğu çalışmada, GSBL pozitif 129 izolatın 30 (%25)'unda blaoxa-48 ile dört izolatta mcr-1 genin varlığını tespit etmiştir. Çalışmada transkonjugasyon testi ile, mcr-1, bla KPC-2 ve bla NDM-1 genlerinin plazmitler üzerindeki transfer edilebilirliğini ve lokalizasyonunu doğrulayarak PFGE plazmit tipi tespit edilmiştir. mcr-1 ve blaoxa-48 direnci saptanan tüm izolatlarda kolistine de dirençli olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızdaki tüm suşların kolistine duyarlı ve karbepenem grubu antibiyotiklerden en az birine karşı dirençli olduğu saptandı

Parlak ve ark. (22) 2021 yılında yapmış oldukları çalışmada, 47 adet karbapenem dirençli ve 80 adet karbapeneme duyarlı olmak üzere 127 *K. pneumoniae* suşunda GSBL enzimi ve OXA-48 enzimini araştırmışlardır. İzolatların %46 (58 izolat)'sı GSBL pozitif bulunmuş ve tüm izolatlarda %33'ünde blaoxa-48 gen bölgesi tespit edilmiştir(22). Sunduğumuz çalışmadaki suşların tamamında GSBL enzimi pozitifti.

Fransa'da Caspar ve ark. (23)'nın 2017 yılında yaptıkları bir çalışmada GSBL pozitif bir *K. pneumoniae* suşunda mcr-1 genine rastlanmıştır. Yeni Kaledonya'da Robin ve ark. 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada, 48 GSBL pozitif *E. coli* suşunun 2'sinde mcr-1 geni (%4,2) bildirmişlerdir (24). Finlandiya'da Gröndahl ve ark. (25) tarafından ilk kez 2016 yılında GSBL pozitif 1 *E. coli* suşunda mcr-1 genine rastlanmıştır. Bizim çalışmamızda da 12 izolatta mcr-1 direnç geni tespit edilmiştir.

Kolistin direnci, özellikle mcr-1 genlerinin ESBL, MBL, NDM genleri gibi diğer çoklu ilaç direnç genleri ile birlikte bulunması ve pan-ilaç direncinin ortaya çıkma olasılığı ile hayatı tehdit eden enfeksiyonların tedavisi için büyük bir sorun haline gelmiştir. El-Baky ve ark. (26) 2020 yılında 175 *P. aeruginosa* suşunda kolistin direncini disk-difüzyon yöntemi ve agar dilüsyon yöntemiyle araştırmışlar, kolistine direnci saptandıkları suşlarda ise moleküler yöntemlerle mcr-1 gen bölgelerini araştırmıştır. Çalışmada, 8 izolatta mcr-1 gen bölgesi ve bu izolatların kolistine dirençli olduğunu rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda gen bölgesi tespit ettiğimiz izolatların tümü kolistine duyarlı idi.

Hameed ve ark. (27) 2019 yılında 62 *A. baumannii* ve 84 *P. aeruginosa* izolatının mcr-1 gen bölgesi araştırdıkları çalışmada, her iki izolattan birinde olmak üzere 2 izolatta gen bölgesini tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda toplamda 12 izolatta mcr-1 gen bölgesi tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, kolistin direncinin referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmaması çalışmamızın kısıtlılığı idi.

SONUÇ

Dünya genelinde yapılan çalışmalardaki direnç oranları oldukça farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılıkların sebepleri olarak antibiyotik kullanımındaki hatalar veya yoğun antibiyotik kullanımı olabilir. Ayrıca veteriner hekimlikte kullanılan yüksek antibiyotik oranı direncin artmasının sebeplerindendir. Karbapenemaz sentezleyen izolatların dağılımlarının takip edilmesi ve uygun tedavinin belirlenmesi açısından bu izolatların saptanması oldukça önemlidir. Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarındakarbapenemaz varlığının ve gen varlığının belirlenmesinde hızlı, tekrarlanabilir ve yüksek doğrulukla saptanması amacıyla uygulanabilecek yöntemlerin belirlenebilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. In house PZR yöntemi kolay uygulanabilir, ucuz ve yaygın olarak kullanılmaktadır.

Sonuç olarak, fenotipik yöntemlerle (disk –difüzyon, otomatize sistemler vb.) karbapeneme dirençli olarak saptanan Gram-negatif bakterilerde direnç genlerinin moleküler yöntemlerle de araştırılması tedavi seçimi ve enfeksiyon kontrolü açısından yararlı olacaktır. Bunun için, daha fazla sayıda bakteri suşunda fenotipik yöntemlerle in house genotipik yöntemlerin karşılaştırıldığı başka çalışmalara da ihtiyaç olduğu görüşündeyiz.

ETIK BEYANLAR

Etik Kurul Onayı: Çalışmada kişiye ait biyolojik materyal kullanılmamıştır, kişisel veri yoktur. Çalışma laboratuvardan izole edilen bakteri suşlarında yapıldığı için etik kurul kararı gerektirmemektedir.

Hakem Değerlendirme Süreci: Harici çift kör hakem değerlendirmesi.

Çıkar Çatışması Durumu: Yazarlar bu çalışmada herhangi bir çıkara dayalı ilişki olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışmada finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Yazar Katkıları: Yazarların tümü; makalenin tasarımına, yürütülmesine, analizine katıldığını ve son sürümünü onayladıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Nukui Y, Ayibieke A, Taniguchi M, et al. Whole-genome analysis of EC129, an NDM-5-, CTX-M-14-, OXA-10- and MCR-1-co-producing *Escherichia coli* ST167 strain isolated from Japan. J Global Antimicrob Resist 2019; 18: 148-50.
2. Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and future of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) infections. Antibiotics (Basel) 2019; 8: 122.
3. Hameed MF, Chen Y, Wang Y, et al. Epidemiological characterization of colistin and carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary: A Hospital from Anhui Province. Infect Drug Resist 2021; 14: 1325-33.
4. Beyrouthy R, Robin F, Lessene A, et al. MCR-1 and OXA-48 In vivo acquisition in KPC-producing *Escherichia coli* after colistin treatment. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61: 8.
5. Di Tella D, Tamburro M, Guerrizio G, Fanelli I, Sammarco ML, Ripabelli G. Molecular epidemiological insights into colistin-resistant and carbapenemases-producing clinical *Klebsiella pneumoniae*isolates. Infect Drug Resist 2019; 12: 3783-95.
6. Lee YL, Lu MC, Shao PL, et al. Nationwide surveillance of antimicrobial resistance among clinically important Gram-negative bacteria, with an emphasis on carbapenems and colistin: Results from the Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART) in 2018. Int J Antimicrob Agents 2019; 54: 318-28.
7. Demir N. Gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörlerinin araştırılması.İstanbul: Dr Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlik tezi 2006.
8. Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 1637-44.
9. Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem resistance: a review. Med Sci 2018; 6: 1.
10. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. Therapeutic Advances Infect Dis 2016; 3: 15-21.
11. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. Clin Microbiol Infect 2014; 20: 821-30.
12. Li Z, Cao Y, Yi L, Liu J-H, Yang Q, editors. Emergent polymyxin resistance: end of an era? Open forum infectious diseases; 2019: Oxford University Press US.
13. Özger HS, Karaşahin Ö, Telli G, Dizbay M. Nozokomiyal *Klebsiella* türleri arasında karbapenem direnç sıklığı ve fenotipik yöntemlerle direncin değerlendirilmesi. Flora Derg 2012; 17: 103-10.
14. Gharaibeh MH, Shatnawi SQ. An overview of colistin resistance, mobilized colistin resistance genes dissemination, global responses, and the alternatives to colistin: a review. Veterinary World 2019; 12: 1735.
15. Baron S, Hadjadj L, Rolain J-M, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. Int J Antimicrob Agents 2016; 48: 583-91.
16. Lu H, Zhang X, Zhang Y, et al. First report of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates co-harbouring mcr-1 and bla(OXA-48) from clinical patients in China. J Global Antimicrob Resist 2018; 13: 945.
17. Lopes E, Saavedra MJ, Costa E, de Lencastre H, Poirel L, Aires-de-Sousa M. Epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in northern Portugal: Predominance of KPC-2 and OXA-48. J Global Antimicrob Resist 2020; 22: 349-53.
18. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56: 559-62.
19. Süzük Yıldız S, Şimşek H, Bakkaloğlu Z, et al. [The Epidemiology of Carbapenemases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated in 2019 in Turkey]. Mikrobiyol Bul 2021; 55: 1-16.
20. Çiğdem A, Tuba D, Tuğcan B, Neslihan G, Rıza D. Investigation of carbapenemase and mcr-1 genes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. J Infect Develop Countr 2019; 13: 6.
21. Bilal H, Rehman TU, Khan MA, et al. Molecular Epidemiology of mcr-1, bla (KPC-2,) and bla (NDM-1) Harboring Clinically Isolated *Escherichia coli* from Pakistan. Infect Drug Resist 2021; 14: 1467-79.
22. Parlak AU, Güdücüoğlu H, Parlak M, Bayram Y, Otlu B. *Klebsiella pneumoniae*suşlarında OXA-48 ve alt türevlerinin araştırılması ve fenotipik yansıma. ANKEM Derg 2021; 35: 1-8.
23. Caspar Y, Maillet M, Pavese P, et al. mcr-1 colistin resistance in ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*, France. Emerg Infect Dis 2017; 23: 874.
24. Robin F, Beyrouthy R, Colot J, et al. MCR-1 in ESBL-producing *Escherichia coli* responsible for human infections in New Caledonia. J Antimicrob Chemother 2017; 72: 946-7.
25. Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Lönnqvist E, Kallonen T, et al. The first human report of mobile colistin resistance gene, mcr-1, in Finland. Apmis 2018; 126: 413-7.
26. Abd El-Baky RM, Masoud SM, Mohamed DS, et al. Prevalence and some possible mechanisms of colistin resistance among multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Drug Resist 2020; 13: 323.
27. Hameed F, Khan MA, Muhammad H, Sarwar T, Bilal H, Rehman TU. Plasmid-mediated mcr-1 gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2019; 52.